Trousse pour la détermination radioimmunologique de la globuline fixant la thyroxine (TBG) sérique

Contenu de la trousse :

1 flacon de ^{125}I-TBG humaine, < 54 kBq, lyophilisé.

1 flacon d'antisérum de mouton anti-TBG, lyophilisé.

6 flacons de standards de TBG, contenant chacun 0,5 ml de sérum de cheval lyophilisé, concentration allant de 0 à 80 µg/ml TBG humaine.

1 flacon de sérum de contrôle de TBG, contenant 0,5 ml de sérum humain lyophilisé, concentration indiquée sur l'étiquette.

1 flacon de solution de polyéthylène glycol, prête à l'emploi, 110 ml.

1 mode d'emploi.

Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. Eviter toute absorption des réactifs ainsi que tout contact avec la peau ou les muqueuses.

1. Introduction

La Thyroxine Binding Globuline (TBG) est une inter-α-globuline de poids moléculaire 60.000. Elle contient 13% d'hydrates de carbone.

La TBG est synthétisée dans le foie ; sa demi-vie biologique est de 5 jours. La concentration de la TBG sérique n'est donc pas soumise à de fortes variations, mais n'est pas non plus constante. L'apport de thyroxine endogène ou exogène, l'âge et, dans une plus faible mesure, le sexe influent sur le taux de la TBG sérique. La TBG est la protéine de transport spécifique quantitativement importante de la thyroxine (T4) et de la triiodothyronine (T3). Une molécule de TBG peut lier une molécule de T4 ou de T3, l'affinité de la liaison étant plus grande pour T4 que pour T3. La capacité de fixation de la TBG est de 20 µg de thyroxine pour 100 ml de sérum, et donc trois fois supérieure à la concentration normale en thyroxine. L'albumine et la préalbumine ne contribuent, dans les conditions normales, que de façon minime au transport de la thyroxine.

La trousse **RIA-gnost®TBG** permet de doser la Thyroxine Binding Globuline sérique in vitro selon le principe de la technique par compétition. La TBG sérique et le traceur TBG marqué à l'iode 125 sont en compétition vis à vis d'une quantité limitée de sites de fixation d'anticorps hautement spécifiques. Après incubation, la séparation de la TBG libre et du complexe anticorps-TBG se fait par précipitation de ce dernier avec du PEG. Après centrifugation du précipité, le surnageant est aspiré ou décanté, et l'activité du traceur marqué à l'iode 125 qui est présent dans le précipité est mesurée. La quantité de TBG contenue dans le sérum est estimée à partir de la gamme construite à l'aide de standards traités de façon analogue.

Le domaine de mesure est compris entre 0 et 80 µg de TBG/ml de sérum, avec un maximum de précision entre 7 et 50 µg/ml.

Les réactifs sont tous lyophilisés, sauf le polyéthylène glycol. Ils doivent être conservés à une **température inférieure à 6°C** . A cette température, la trousse peut être utilisée jusqu'à la date de péremption inscrite sur l'étiquette.

Aucune réaction croisée significative de l'antiserum anti-TBG avec des globulines α_1 ou α_2 ni avec l'inhibiteur de l'inter-α-trypsine n'a pu être mise en évidence avec les méthodes employées actuellement.

Une comparaison des taux de la TBG sérique obtenus en radioimmunologie, immunoélectrophorèse (technique de Laurel) et immunodiffusion radiale a donné dans la plupart des cas une bonne corrélation.

2. Intérêt clinique du dosage quantitatif de la TBG

Etant donné que seules les hormones thyroïdiennes libres (dont on sait que la concentration sérique est nettement inférieure à 1 %) jouent un rôle dans le métabolisme, il est nécessaire d'estimer la liaison protéique de la thyroxine pour évaluer la fonction thyroïdienne.

Le renseignement le plus intéressant fourni par le dosage de la TBG est le rapport T4/TBG qui rend possible un diagnostic différentiel entre euthyroïdie, hypothyroïdie et hyperthyroïdie.

Le dosage quantitatif de la TBG seule n'a de valeur strictement diagnostique que pour les rares patients souffrant d'une anomalie de la TBG le plus souvent héréditaire.

3. Résultats cliniques de la trousse RIA-gnost®TBG

3.1 Valeurs normales de la TBG

Chez 368 euthyroïdiens sains, de 17 à 60 ans, la valeur moyenne de concentration de la TBG sérique est de 20,6 ± 4,8 µg/ml, le domaine de mesure étant compris entre 10 et 42 µg/ml. La différence entre les valeurs des hommes et celles des femmes est négligeable (♂ 19,7 ± 5,5 ; ♀ 21,1 ± 5,3 µg TBG/ml).

En revanche, la concentration de la TBG **dépend nettement de l'âge**. Sur 596 euthyroïdiens sains, le taux de la TBG est à son maximum dans la première année de la vie, puis diminue progressivement jusqu'à l'âge adulte.

âge (années)		1-10	11-16	17-60	> 60
TBG (µg/ml)	x	31,5	24,1	20,5	19,9
	1s	14	6,5	4,8	6,0

CISBIO Bioassays
Member of IBA group

La prise de contraceptifs oraux contenant des œstrogènes augmente la valeur moyenne de la TBG sérique qui passe à 28,0 ± 5,0 µg/ml. Pendant la grossesse, la TBG sérique augmente entre la 10ème et la 30ème semaine, et passe à 50 µg/ml, puis reste à ce niveau jusqu'à la fin de la grossesse.

Les patients porteurs d'un goitre euthyroïdien ont une TBG sérique normale (20,8 ± 4,6 µg/ml) ainsi que ceux ayant une hyperthyroxinémie (x 19,5 ± 5,0 µg/ml). Par contre, les patients souffrant d'hypothyréose ont un taux légèrement augmenté (x 25,3 ± 4,8 µg/ml).

3.2 Importance du rapport T4/TBG

Les données publiées dans la littérature et les résultats des examens cliniques effectués avec la trousse RIA-gnost®TBG ont permis de constater que le **rapport T4/TBG** est bien corrélé avec la **T4 libre**.

$$\text{Le rapport } \frac{\text{ng T4/ml x 1000}}{\text{µg TBG/ml}} \text{ est de 4,3 ± 1,2 pour une euthyroïdie.}$$

En cas **d'hypothyroxinémie**, le rapport tombe à **1,1 ± 0,9** et passe à **11,2 ± 3,6** (pour le groupe de personnes étudié jusqu'à présent) pour une **hyperthyroïdie.**

Quant aux cas limites entre **l'hypothyroïdie et l'euthyroïdie** pour lesquels il est difficile d'établir un déficit, le rapport T4/TBG permet de les différencier facilement. Une forte augmentation de la TBG, lors d'une grossesse par exemple, est également beaucoup mieux mise en évidence par ce rapport que par les méthodes indirectes de dosage utilisées jusqu'à présent.

Une augmentation endogène ou exogène due à des œstrogènes (grossesse ou contraceptifs oraux) ne conduit pas forcément à une augmentation correspondante de T4. La valeur moyenne du rapport T4/TBG peut donc être réduite, ce qui explique que les valeurs extrêmes peuvent parfois se trouver dans le domaine limite de l'hypothyroïdie.

Dans ces cas là, il faut, en relation avec l'image clinique, réfléchir sur l'opportunité d'effectuer un test TRH permettant de prendre des mesures thérapeutiques adéquates.

Rapport T4/TBG dans différentes situations cliniques

	Euthyroïdie	Hypothyroïdie	Hyperthyroïdie	contraceptifs oraux
X	4,3	1,1	11,2	3,6
1 DS	1,2	0,9	3,6	0,8
Domaine	3,1-5,2	0,2-2,0	7,6-14,8	2,4-4,4

3.3 Anomalies de la TBG

Un taux de TBG sérique inférieur à 10 µg/ml indique une anomalie génétique. Le faible nombre de cas étudiés n'a pas encore permis de déterminer dans quelle mesure le dosage du rapport T4/TBG est aussi intéressant dans ces cas extrêmes. Il est probable que ce sont l'albumine et la préalbumine qui, dans ces cas là, se chargent du transport des hormones thyroïdiennes.

4. Mode d'emploi

4.1. Matériel nécessaire

Tubes à essai, 3-5 ml, micropipettes avec embout plastique interchangeable de 20 µl, 200 µl et 500 µl, pipette avec embout interchangeable de 1 ml
ou bien
distributeurs de 200 µl, 500 µl et de 1 ml, pipettes et éprouvettes graduées (20 ml), agitateur type vortex, centrifugeuse (de préférence réfrigérée) 1500 g minimum, ($g=1{,}11 \times 10^{-5} \times (tpm^2) \times$ rayon en cm), compteur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125

4.2. Préparation des réactifs

Reconstituer avec précaution les réactifs de la trousse par de l'eau distillée suivant le tableau 1, à l'exception de la solution de polyéthylène glycol prête à l'emploi.

Tabl. 1 : reconstitution des réactifs du coffret

Réactifs	Eau distillée
standards S_0-S_5	500 µl
sérum de contrôle	500 µl
traceur 1^{25}I-TBG	20 ml
antisérum anti-TBG	20 ml
110 ml de polyéthylène glycol (prêt à l'emploi)	-

Décoller éventuellement les particules de lyophilisat qui adhèrent au bouchon en tapant **les flacons de standard et de sérum de contrôle** sur une surface dure. Ouvrir avec précaution et poser le bouchon à plat sur la paillasse. Reconstituer avec exactement **500 µl d'eau distillée** (à l'aide d'une micropipette appropriée), reboucher avec le bouchon correspondant et attendre **la reconstitution complète** du lyophilisat (environ 10 minutes). Pour aider la dissolution et l'homogénéisation de la solution, agiter le flacon en traçant des cercles et/ou le rouler entre les mains.
Ouvrir les autres flacons avec la même précaution, reconstituer le **traceur ^{125}I-TBG** et **l'anti-sérum anti-TBG** dans **20 ml d'eau distillée** chacun. Aider la dissolution des lyophilisats en agitant les flacons de façon concentrique. Pour l'eau distillée, utiliser de préférence des pipettes de la grandeur appropriée.

4.3. Remarques générales

Les réactifs provenant de différentes trousses d'un même lot peuvent être rassemblés si l'on fait un grand nombre de dosages. Ne tracer alors qu'une seule courbe standard pour tous les échantillons.

Après reconstitution, on peut conserver les réactifs à 2-8°C. Il est déconseillé de conserver les réactifs plus de deux semaines à cause du risque de contamination microbienne.

4.4. Préparation des sérums à doser

Après le prélèvement sanguin, préparer le sérum ou le plasma selon le procédé habituel. Distribuer le sérum directement dans les tubes, ou le conserver 24 heures au maximum à 2-8°C. Au-delà de 24 heures, le conserver à -20°C. Il est alors conseillé de constituer des aliquotes, car des congélations et des décongélations répétées peuvent affecter la qualité des échantillons.
On peut également utiliser des échantillons plasmatiques, le dosage n'étant pas influencé par l'héparine ni par l'EDTA.

4.5. Mise en garde et précautions d'emploi

Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousses agréées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti-HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.

4.6. Protocole de dosage (cf. tabl. 2)

Numéroter les tubes à incubation (3-5 ml) comme le montre le tableau 2 (6 standards, le sérum de contrôle, les échantillons et l'activité totale). Placer les tubes dans des portoirs appropriés.
Après reconstitution, vérifier l'absence de particules en suspension, homogénéiser les **standards** et distribuer des aliquotes de **20 µl** dans chacun des tubes correspondants (n°1-12). Il est recommandé de changer d'embout pour chaque standard.

Distribuer, après homogénéisation, **20 µl de sérum de contrôle** dans chacun des tubes 13 et 14.
Homogénéiser les **échantillons** et distribuer des aliquotes de 20 µl dans les tubes appropriés 15, 16, 17, 18, etc… Changer d'embout pour chaque sérum.

La précision des pipetages de 20 µl est capitale.

Distribuer 200 µl de **traceur ^{125}I-TBG** dans tous les tubes (y compris ceux destinés au comptage de l'activité totale). Mélanger au vortex.
Distribuer 200 µl **d'antisérum anti-TBG** dans tous les tubes (exceptés ceux de l'activité totale). Agiter de nouveau.

Boucher chacun des tubes d'un bouchon ou recouvrir le tout de parafilm et laisser **incuber pendant 0,5 heures à température ambiante (17-27°C)** à l'abri de la lumière. Le temps d'incubation peut aller jusqu'à 4 heures.

Les étapes suivantes doivent s'enchaîner sans interruption.
Distribuer dans chacun des tubes (sauf ceux de l'activité totale) 1 ml de PEG à température ambiante. Utiliser un distributeur automatique approprié ou bien des pipettes dont on peut agrandir le trou en le coupant.
Agiter tous les tubes (exceptés ceux de l'activité totale) plusieurs fois au vortex et vérifier que l'émulsion est bien réalisée.
Centrifuger le précipité pendant 20 minutes à 1500 g et à 5-27°C. (Si le surnageant n'est pas clair, répéter le dosage de l'échantillon).
Aspirer le surnageant après la centrifugation. Tenir pour cela les tubes légèrement inclinés.
Le surnageant peut également être **décanté**. Dans ce cas, poser les tubes 10 minutes à l'envers sur papier absorbant, pour éliminer le restant de polyéthylène glycol.
Compter tous les tubes (y compris ceux de l'activité totale) à l'aide d'un compteur gamma pendant 60 secondes. On compte 20 000 à 40 000 cpm pour les tubes de l'activité totale, suivant l'âge de la trousse et le rendement de l'appareil de mesure.

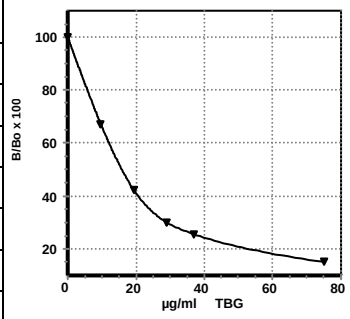
Tab. 2 : Protocole de dosage de la TBG

	Standards (µl)						Sérum de contrôle (µl)	Echantillons (µl)			Activité totale (µl)
N° des tubes à essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	etc.	
Standards S_0 S_1 S_2 S_3 S_4 S_5	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20	20/20					
Sérum de contrôle							20/20				
Echantillons 1 Echantillons 2 etc.								20	20	etc.	
Traceur ^{125}I-TBG	◄---------- 200 µl ----------										----------►
Antisérum anti-TBG	◄---------- 200 µl ----------►										
	Mélanger ; recouvrir de parafilm ; incuber 0,5 heures (jusqu'à 4 h) à température ambiante (17-27°C)										
Polyéthylène glycol (PEG)	◄---------- 1 ml ----------►										
	Mélanger aussitôt ; centrifuger (20 min. > 1500 g ; 5-27°C)										
	Aspirer ou décanter le surnageant										
	Compter le précipité										Compter la solution

CISBIO Bioassays
Member of IBA group

Fig.1 : Exemple de courbe d'étalonnage

Groupe de tubes	cpm moyens	B/T x 100	B/Bo x 100	Concentration µg/ml
T	23803			
Standard 0	20754	87,2	100	0
Standard 1	13953		67,2	9,7
Standard 2	8752		42,2	19,4
Standard 3	6224		30,0	29,0
Standard 4	5303		25,5	37,0
Standard 5	3123		15,0	75,0
Contrôle	7623		36,7	22,7



4.7. Exploitation des résultats
La figure 1 représente une courbe standard type établie à l'aide de la trousse RIA-gnost®TBG.
Relever toutes les valeurs mesurées (y compris la valeur zéro) ; elles représentent le traceur ^{125}I-TBG qui est lié à l'anticorps.
Reporter sur papier millimétré adéquat d'une part, le nombre de coups par minute des standards S_0-S_5, et d'autre part les concentrations de TBG correspondantes (µg/ml). Les points servent à tracer la courbe standard.
Marquer les valeurs du sérum de contrôle et des sérums à doser, puis lire sur la courbe d'étalonnage la concentration de TBG.
Il est d'autre part conseillé de calculer le rapport de chacun des standards S_1 à S_5 au standard S_0 et de reporter la valeur moyenne du rapport relatif (% de S_0 = 100) en ordonnée. On portera en abscisse la concentration de TBG. Les points serviront également à tracer la courbe standard.

Il n'existe actuellement aucun standard TBG international servant de valeur de référence aux valeurs mesurées.

5. Règles de base de radioprotection
Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires couverts par cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée ni à l'homme ni aux animaux.
L'achat, la détention, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.
L'application des règles de base de radioprotection assure une sécurité adéquate.
Un aperçu en est donné ci-dessous :
Les produits radioactifs seront stockés dans leur conteneur d'origine dans un local approprié.
Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
La manipulation de produits radioactifs se fera dans un local approprié dont l'accès doit être réglementé (zone contrôlée).
Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques en zone contrôlée.
Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
Toute élimination de déchets radioactifs se fera conformément aux réglementations en vigueur.